

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659198

研究課題名(和文)細菌分泌系ATPaseの活性型超複合体形成における新規機能

研究課題名(英文)T4SS supermolecular complex containing core complex and ATPase

研究代表者

永井 宏樹 (Nagai, Hiroki)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：80222173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：病原菌は感染を成立させるため、細菌由来のタンパク質を宿主細胞に輸送します。この輸送を司る、したがって感染現象の鍵となる細菌分泌装置はいくつかのタイプに分類されていますが、ヒロリ菌やレジオネラが持つIV型分泌装置の実体はほとんどわかっていませんでした。本研究では、我々が同定したIV型分泌装置のコア複合体に加えて、内膜タンパク質DotI複合体および細胞質内ATPase Dot0を含む、より大きな超分子複合体の実態を明らかにすることができました。

研究成果の概要(英文)：Bacterial pathogens manipulate host cellular processes using their own proteins. These proteins, so-called effectors, are injected into host cells using specialized nanomachines assembled on the bacterial cell surface. One such nanomachine is the type IV secretion system (T4SS). we have successfully showed the electron microscopic structure of the core complex of the Legionella Dot/Icm T4SS. Here we report in vivo evidence for a larger complex containing the core complex, DotI-DotJ inner-membrane complex and ATPase Dot0, which is essential for Legionella pathogenesis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：細菌 タンパク質分泌 IV型分泌 レジオネラ 接合伝達

1. 研究開始当初の背景

病原細菌のタンパク質分泌系として、最初にその分子構造が電子顕微鏡レベルで明らかにされた III 型分泌系は、注射器によく似た針状の突起を持つ特徴的な構造を有し、宿主細胞に直接タンパク質を注入するという機能を合理的に説明した (Kubori et al., *Science* 1998)。一方、様々な病原細菌で多様な役割を担う IV 型分泌系は、接合伝達系と起源を共にするという点から分類された病原因子輸送系であり、接合伝達系も IV 型分泌系の一種として位置づけられる。輸送基質は毒素・エフェクタータンパク質、伝達性プラスミドや可動性遺伝因子など多岐に渡ることが大きな特徴である。病原性発現の機構解明への糸口となるばかりでなく、遺伝子水平伝達による多剤耐性菌の出現を引き起こす経路の機構解明のためにもその全貌の解明が待望されている。しかしながら、IV 型分泌系は、遺伝子群の構成や、輸送基質分子の種類・大きさ、複雑さ・局在などが非常に多様であることから、極めて多岐に渡る輸送活性を持つと考えられ、輸送装置の実体や輸送メカニズムについては近年にいたるまでほとんど理解されていなかった。

IV 型分泌系は配列上の相同性などからさらに IVA 型・IVB 型に分類されており、両者とも多くの病原細菌・接合プラスミドに存在している。IVA 型では 2004 年、Christie らが宿主植物細胞に DNA を輸送する病原菌 *Agrobacterium tumefaciens* の VirB 分泌系において基質 DNA と直接相互作用する輸送装置コアタンパク質を同定した (Cascales et al. *Science*)。2009 年に、Waksman らは IVA 型分泌系の細菌内外膜を貫通するコア複合体を単離し (Fronzes et al. *Science*)、さらにその外膜部分複合体をそのまま結晶化することにより原子構造を解き明かした (Chandran et al. *Nature*)。一方 IVB 型分泌系の構造はこれまで全くわかっていなかった。我々はヒト病原菌 *Legionella pneumophila* の Dot/Icm IVB 型分泌系を構成する個々のタンパク質およびタンパク質複合体の構造・機能解析を行ってきたところ、本研究と平行して遂行していた基盤研究(B)において、細菌病原性に必須な IV 型分泌系として世界で初めてそのコア複合体の単離・解析に成功することとなった (Kubori et al. *PNAS* 2014)。

IV 型分泌系の「コア複合体」は内膜側半分が中空構造をしており、実際の分泌活性のある超複合体の形成には、さらなる内膜タンパク質の組み込みが必要であると想定される。一方で、コア複合体は閉じた構造をしており、内膜タンパク質を組み込むには何らかの構造変化が必要である。Dot/Icm IVB 型分泌系を構成する内膜タンパク質 DotI は、コア複

合体構成タンパク質と同一オペロン上直上流にコードされており、コア複合体に組み込まれるタンパク質の有力な候補と考えられた。さらに我々は、Dot/Icm IVB 型分泌系を構成する 3 つの ATPase の内の一つ DotO が、内膜タンパク質 DotI により安定化されていることを見出していた。これは DotI-DotO が相互作用することを示唆している。このような予備的な知見から、コア複合体・DotI 内膜タンパク質・DotO ATPase を含む超分子複合体が存在するという仮説を建てた。

2. 研究の目的

本研究では、新たな超分子複合体検出法を確立することによって上述の仮説を検証し、タンパク質複合体形成における ATPase の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

レジオネラ菌体内での超分子複合体を検出するため、遺伝学的・生化学的相互作用解析を行う。なお、本研究期間中にコア複合体単離の技術を確立したため、一部当初計画を変更して、同様の手法による超分子複合体単離を試みた。

4. 研究成果

(1) 超分子複合体の遺伝学・生化学的解析

DotI-DotO 相互作用

DotI を欠損するレジオネラ株では、DotO の細胞内レベルが減弱する。DotI は一回膜貫通型の細菌内膜タンパク質であり、大きなペリプラズム領域を持っている。このペリプラズム領域を欠損しても、DotO レベルへの影響はみられなかった。さらに、我々が作成していた様々な DotI ペリプラズム領域点突然変異による影響を検討したところ、有意な変化は見られなかった。これらのことは、DotI の細胞質内から内膜貫通領域が DotO との相互作用に関わることを示唆している。一方、DotO の欠損による DotI の不安定化などは観察されなかった。実際、DotI はその部分パラログ DotJ と安定なヘテロ複合体を形成し、さらにこの複合体形成には他の IV 型分泌系構成タンパク質は必要でないことを、並行研究により明らかにしている。このことは少なくとも DotI-DotJ 複合体形成には DotO ATPase は関与しないことを示している。

DotO-DotI-コア複合体相互作用

細菌内外膜をスクロース密度勾配遠心法により分画すると、コア複合体構成タンパク質は主として外膜画分に分画される。本来細胞質内 ATPase である DotO は同

様の解析により、やはり外膜画分に分画される。DotO の外膜画分への分画はコア複合体構成タンパク質欠損株ではみられなくなるが、DotO はやはり膜画分に分画される。さらに DotI を欠損すると、細胞質にも分画されるようになる。これらのことは、DotI を介して DotO がコア複合体依存的に外膜画分へ分画されることを示しており、DotO-DotI-コア複合体が超分子複合体を形成することを示唆している。

(2) 超分子複合体単離の試み

既述の通り、我々は本研究遂行中にコア複合体をレジオネラ菌体から単離する手法を確立した。このため、当初計画を変更し、同様の手法による超分子複合体の単離を試みた。コア複合体が濃縮される画分に存在するタンパク質を網羅的に同定するためショットガン質量分析法により解析したところ、コア複合体構成タンパク質(DotC, DotD, DotF, DotG, DotH)以外にも複数の Dot/Icm タンパク質をマイナーな構成タンパク質候補として同定したが、残念ながら DotI, DotJ, DotO は含まれていなかった。この方法では比較的強い条件で細胞を融解しており、不安定な超複合体をそのまま単離するためにはよりマイルドな溶解条件探索が必要と考えられた。今後、細胞内の超複合体を直接観察できる電顕トモグラフィ法などの活用を視野にいれた研究に発展させていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Kuroda T, Kubori T, Thanh Bui X, Hyakutake A, Uchida Y, Imada K, Nagai H. Molecular and structural analysis of *Legionella* DotI gives insights into an inner membrane complex essential for type IV secretion. *Sci Rep* **5**, 10912 (2015). doi: 10.1038/srep10912 査読有り
2. Nagai H. [Host-pathogen interaction of *Legionella pneumophila*]. *Nihon Saikingaku Zasshi* **69**, 503-511 (2014). https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsb/69/3/69_503/pdf 査読無し
3. Kubori T, Koike M, Bui XT, Higaki S, Aizawa SI, Nagai H. Native structure of a type IV secretion system core complex essential for *Legionella* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, 11804-11809 (2014). doi:

10.1073/pnas.1404506111 査読有り

〔学会発表〕(計 23 件)

1. 永井 宏樹、久堀 智子、Xuan Thanh Bui, 相沢慎一、今田 勝巳、レジオネラ病原性に必須な IV 型分泌装置の構造生物学、第88回日本細菌学会総会ワークショップ、2015年3月26(26-28)日、長良川国際会議場(岐阜)
2. 永井宏樹、レジオネラ病原性の分子基盤、平成26年度第24回学会賞受賞者特別講演会、2015年1月29日、北里大学(東京)
3. Kubori T, Koike M, Bui XT, Higaki S, Aizawa SI, Nagai H. Native structure of a type IV secretion system core complex essential for *Legionella* pathogenesis. 第13回あわじしま感染症・免疫フォーラム、2014年9月23-26日、奈良県新公会堂(奈良)
4. 久堀 智子, 永井 宏樹, “Structural analysis of a type IV secretion system core complex essential for bacterial virulence” 第87回日本細菌学会総会、2014年3月26日(26-28)、タワーホール船堀(東京)
5. 永井宏樹、久堀智子、Xuan Bui Thanh、小池雅文、桧垣沙緒里、相沢慎一“ヒト病原菌レジオネラの病原因子輸送装置”分子遺伝学シンポジウム2014新しい生命像を導いた大腸菌遺伝学の系譜、2014年3月1日、京都大学北部総合教育研究棟・益川ホール(京都)
6. Hiroki Nagai, Tomoko Kubori, Masafumi Koike, Saori Higaki and Shin-ichi Aizawa, “Structural analysis of a type IV secretion system core complex essential for bacterial virulence.”, Cold Spring Harbor Asia meeting on Bacterial Infection and Host Defense, Nov. 19, 2013, (18-22) Suzhou, China
7. Hiroki Nagai, Tomoko Kubori, Masafumi Koike, Saori Higaki, Shin-ichi Aizawa, Takuya Kuroda, Miki Kinoshita, Yumiko Uchida and Katsumi Imada, “Structural analysis of the type IVB secretion system” The 8th International Conference on *Legionella*, Nov. 1, 2013, (29-1) Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia.
8. Tomoko KUBORI, Takuya KURODA, Xuan Thanh BUI, Yumiko UCHIDA, Katsumi IMADA and Hiroki NAGAI, “CHARACTERIZATION OF LEGIONELLA DOTI AND DOTJ SUBCOMPLEX REVEALS A VIRB8-LIKE STRUCTURE ESSENTIAL FOR TYPE IV

- SECRETION SYSTEM.”, Oct 31, 2013, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia.
9. Hiroki Nagai, Tomoko Kubori, Masafumi Koike, Saori Higaki and Shin-ichi Aizawa, “Interdomain protein transport: a critical strategy employed by bacterial pathogens and symbionts.” 第12回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2013年9月13日、淡路夢舞台国際会議場、(兵庫県)
 10. Tomoko Kubori, Takuya Kuroda, Yumiko Uchida, Katsumi Imada, Hiroki Nagai, “Characterization of *Legionella* DotI and DotJ subcomplex reveals a VirB8-like structure essential for type IV secretion.” 第12回あわじしま感染症・免疫フォーラム 2013年9月11日、淡路夢舞台国際会議場、(兵庫県)
 11. 永井宏樹、久堀智子、小池雅文、桧垣沙緒里、相沢慎一、“レジオネラ Dot/Icm IVB型分泌系のコア複合体”、第7回細菌学若手コロッセウム、2013年8月8日(7-9)、フォレストヒルズガーデン / 広島エアポートホテル(広島)
 12. 永井宏樹、Interdomain protein transfer as a critical mechanism for Matryoshka-type evolution. 第2回マトリョーシカ型生物学研究会、2013年7月24日、ホテル京都ガーデンパレス
 13. Tomoko Kubori, Takuya Kuroda, Xuan Thanh Bui, Yumiko Uchida, Katsumi Imada and Hiroki Nagai, Characterization of *Legionella* DotI and DotJ subcomplex reveals a VirB8-like structure essential for type IV secretion function. Gordon Research Conference, Microbial Adhesion & Signal Transduction, July 21-26, 2013, Salve Regina University, Newport, RI, USA
 14. 永井宏樹、レジオネラ Dot/Icm IVB型分泌系の進化・構造・機能、第10回21世紀大腸菌研究会、2013年06月20日、ラフォーレ修善寺(静岡)
 15. Tomoko Kubori, Takuya Kuroda, Yumiko Uchida, Katsumi Imada, Hiroki Nagai Structural analysis of the DotI/DotJ subcomplex in the *Legionella* type IVB secretion system. 第86回日本細菌学会総会、2013年03月18日、幕張メッセ(千葉県)
 16. Saori Higaki, Masafumi Koike, Tomoko Kubori, Shin-Ichi Aizawa, Hiroki Nagai Purification and structural analysis of type IV secretion apparatus in *Legionella pneumophila*. 2012年度べん毛交流会、2013年03月04日、伊香保温泉(群馬県)
 17. 小池雅文、桧垣沙緒里、久堀智子、相沢慎一、永井宏樹レジオネラ IVB型分泌系置コア構造体の電子顕微鏡による構造解析、感染症若手フォーラム 2013、2013年03月01日、北広島クラッセホテル(北海道)
 18. 黒田琢弥、内田裕美子、久堀智子、永井宏樹、今田勝巳 IV型分泌系構成蛋白質 DotIの構造、第85回日本生化学会大会、2012年12月15日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県)
 19. Nagai, H. Interdomain protein transport: a critical strategy employed by bacterial pathogens and symbionts, 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月13日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県)
 20. Tomoko Kubori, and Hiroki Nagai, *Legionella* DotI and DotJ form a multimeric subcomplex associated with the core complex of the Dot/Icm type IVB secretion system. 日本生物物理学会第50回年会、2012年09月23日、名古屋大学(名古屋)
 21. Kuroda T, Uchida Y, Kubori T, Nagai H, Imada K, Structure of DotI, a core component of the Type IVB secretion system. 日本生物物理学会第50回年会、2012年09月22日、名古屋大学(名古屋)
 22. Tomoko Kubori, Takuya Kuroda, Katsumi Imada and Hiroki Nagai, *Legionella* DotI and DotJ form a multimeric subcomplex associated with the core complex of the Dot/Icm type IVB secretion system. 第11回淡路島感染症・免疫フォーラム、2012年09月13日、淡路夢舞台国際会議場(兵庫県)
 23. 永井宏樹、レジオネラ Dot/Icm IVB型分泌系の進化・構造・機能、第9回21世紀大腸菌研究会、2012年06月22日、長浜ロイヤルホテル(滋賀)
- {その他}
研究室ホームページ
<http://nagailab.biken.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井宏樹 (NAGAI, Hiroki)
大阪大学・微生物病研究所・准教授
研究者番号：80222173